

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Studij medicine**

**Nives Šalek**

**PREVALENCIJA INVERZIJE INTRONA**  
**22 I INTRONA 1 GENA ZA FVIII U**  
**BOLESNIKA S HEMOFILIJOM A**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2018.**



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Studij medicine**

**Nives Šalek**

**PREVALENCIJA INVERZIJE INTRONA**  
**22 I INTRONA 1 GENA ZA FVIII U**  
**BOLESNIKA S HEMOFILIJOM A**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2018.**

Rad je ostvaren u Kliničkom bolničkom centru Osijek, na Kliničkom odjelu za hematologiju, Kliničkom bolničkom centru Zagreb, na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, Odjelu za citogenetiku, Odjelu za laboratorijsku hematologiju i koagulaciju te Referentnom centru Ministarstva zdravstva RH za nasljedne i stečene bolesti hemostaze.

Mentor rada: prof. dr. sc. Aleksandar Včev, prim. dr. med.

Rad ima 24 lista, 7 tablica i 4 slike.

## **ZAHVALA**

*Zahvaljujem se mentoru prof. dr. sc. Aleksandru Včevu prim. dr. med. na vodstvu i strpljenju tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Nadalje, hvala prof. Kristini Kralik na pomoći pri statističkoj obradi podataka.*

*Hvala mom hrabrom timu: Ani, Darjanu, Dori, Filipu, Ivoni, Krešimiru i Mirni, koji su koračali kroz moje šestogodišnje školovanje i sa mnom dijelili i suze i smijeh, te Luki i Borni na svim dobronamjernim savjetima.*

*Posebno hvala mojim najmilijima: Silvi, Zvonku i Zrinku koji su mi pružali beskrajnu podršku, snagu, a nadasve ljubav kroz svih godina moga studija.*

***„Čovječe pazi  
da ne ideš malen  
ispod zvijezda!“***

**- A. B. Šimić**

<b>SADRŽAJ</b> .....	I
<b>POPIS KRATICA</b> .....	II
<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Hemofilija A.....	1
1.1.1. Epidemiologija.....	1
1.1.2. Klasifikacija i kliničke karakteristike.....	1
1.1.3. Dijagnostika.....	2
1.1.4. Liječenje.....	2
1.1.5. Komplikacije liječenja hemofilije.....	3
1.2. Struktura i funkcija gena za FVIII.....	4
1.2.1. Mutacije gena za FVIII.....	4
1.2.1.1. Inverzija introna 22.....	5
1.2.1.2. Inverzija introna 1.....	6
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	7
<b>3. ISPITANICI I METODE</b> .....	8
3.1. Ustroj studije.....	8
3.2. Ispitanici.....	8
3.3. Metode.....	8
3.4. Statističke metode.....	9
<b>4. REZULTATI</b> .....	10
<b>5. RASPRAVA</b> .....	14
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	18
<b>7. SAŽETAK</b> .....	19
<b>8. SUMMARY</b> .....	20
<b>9. LITERATURA</b> .....	21
<b>10. ŽIVOTOPIS</b> .....	24

## **POPIS KRATICA**

**FVIII** – faktor VIII

**BU** – Bethesda jedinica (engl. *Bethesda unit*)

**rFVIIa** – aktivirani rekombinantni faktor VII

**HIV** – virus humane imunodeficijencije

**HCV** – virus hepatitisa C

**HAV** – virus hepatitisa A

**HBV** – virus hepatitisa B

**HDV** – virus hepatitisa D

**HEV** – virus hepatitisa E

**CMV**- citomegalovirus

**EBV** – Epstein - Barrov virus

**aPCC** – koncentrat aktiviranog protrombinskog kompleksa (engl. *activated prothrombin complex concentrate*)

**F8** – gen za faktor VIII

**X-kromosom** – ženski spolni kromosom

**inv1** – inverzija introna 1

**inv22** – inverzija introna 22

**LD-PCR** – polimerazna lančana reakcija dugih odsječaka (engl. *Long distance-Polymerase Chain Reaction*)

## **1. UVOD**

### **1.1 Hemofilija A**

Hemofilija A ili klasična hemofilija spolno je vezani recesivni nasljedni poremećaj zgrušavanja krvi. Uzrok su hemofilije heterogene mutacije gena FVIII. Uslijed različitih mutacija dolazi do smanjene proizvodnje faktora zgrušavanja VIII ili stvaranja inaktivne molekule. Osnovne su karakteristike bolesti spontana krvarenja posebice u velike zglobove, mišiće te produžena i pojačana posttraumatska krvarenja. Opetovana krvarenja u velike zglobove uzrokuju hemofiličnu artropatiju i glavni su uzrok morbiditeta u bolesnika s hemofilijom (1).

#### **1.1.1. Epidemiologija**

Hemofilija A nasljedni je poremećaj krvi i ubraja se u rijetke bolesti. Javlja se u 1 na 5000 muške novorođenčadi. Rezultati ispitivanja pokazali su da je prevalencija oko 11,2 slučaja na 100 000 muškaraca u svim etničkim skupinama. Uobičajeno su zahvaćena muška djeca, dok su žene nositeljice bolesti. Sve kćeri oca s hemofilijom A nositeljice su dok su sinovi zdravi. Majka nositeljica ima 50 % vjerojatnost za rođenje zdravog te 50 % vjerojatnost za rođenje sina s hemofilijom A. Nasljeđuje se recesivno, spolno vezano (2). Žene, nositeljice bolesti mogu imati sniženu aktivnost FVIII i imitirati blagu hemofiliju A.

#### **1.1.2. Klasifikacija i kliničke značajke**

Klinički se hemofilija A očituje prekomjernim krvarenjima u velike zglobove na koje otpada 75 % lokalizacije te su glavni uzročnik morbiditeta u bolesnika s hemofilijom. Krvarenja u mišiće bez kompresije vitalnih struktura česta su nakon traume te spontana, u visceralne organe. Najopasnija su krvarenja u središnji živčani sustav.

Klinički, hemofilična artropatija očituje se ukočenosti zgloba, smanjenom pokretljivošću i kroničnom boli. U najtežim slučajevima dolazi do ankiloze zgloba i njegove nefunkcionalnosti. Napredovanjem bolesti razvija se teška invalidnost i bitno se smanjuje kvaliteta života bolesnika s hemofilijom A (3).

Prema razini faktora koji nedostaje u krvi, hemofilija se klasificira kao teška, umjerena i blaga (Tablica 1.). Definicija i klasifikacija hemofilije A utemeljena je na preporukama



Internacionalnog društva za trombozu i hemostazu (ISTH) (4). Razina aktivnosti FVIII pretpostavlja klinički tijek bolesti, težinu i učestalost krvarenja.

Tablica 1. Klasifikacija hemofilije A

<b>RAZINA ČIMBENIKA VIII</b>	<b>KLASIFIKACIJA</b>
<b>&lt; 0,01 IU/ml (15 normale)</b>	<b>Teška</b>
<b>0,01 – 0,05 IU/ml (1 – 5 % normale)</b>	<b>Umjerena</b>
<b>&gt; 0,05 – &lt; 0,40 IU/ml (&gt; 5 – 40 % normale)</b>	<b>Blaga</b>

Teški oblik hemofilije A ima aktivnost FVIII manju od 1 %. Klinički se očituje pojavom spontanih krvarenja u velike zglobove i mišiće već tijekom prve godine života. Bolesnici s umjerenim oblikom bolesti imaju razinu FVIII od 1 – 5 %, a krvare rjeđe od bolesnika s teškim oblikom bolesti. Blagi oblik bolesti ima razinu FVIII od 5 – 40 %, a krvarenja se pojavljuju samo pri traumi.

### 1.1.3. Dijagnostika

Dijagnoza hemofilije A postavlja se određivanjem razine aktivnosti FVIII te se razvrstava prema težini bolesti. Posumnjati se može na bolest na temelju kliničke slike, produženog aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena i pozitivne anamneze o spontanim krvarenjima, kao i pozitivne obiteljske anamneze (5). Bolest je moguće dijagnosticirati vrlo rano, mjereći aktivnost faktora VIII iz krvi pupkovine neposredno nakon poroda ili odrediti u 12. tjednu trudnoće biopsijom korionskih resica (6). Ako se radi o sporadičnom slučaju hemofilije u obitelji, potrebno je isključiti von Willebrandovu bolest tipa 3 i tip Normandy testiranjem aktivnosti von Willebrandova faktora (5).

### 1.1.4. Liječenje

Cilj je liječenja spriječiti i zaustaviti akutnu epizodu krvarenja, smanjiti ili prekinuti pojavu akutnih epizoda krvarenja te održati normalnu funkciju zglobova.

U liječenju hemofilije A danas se primjenjuju koncentraci faktora VIII iz ljudske plazme i oni koji su proizvedeni rekombinantnom tehnologijom. Obje skupine ubrajaju se u tzv. kratkodjelujuće FVIII. Rekombinantni koncentraci FVIII ne mogu prenijeti zaraze virusima koji se prenose krvlju, te se smatraju sigurnim lijekovima. Novost u liječenju hemofilije A dugodjelujući su koncentraci faktora VIII s produženim vremenom eliminacije lijeka. Predstavljaju napredak u liječenju, osobito u djece zbog manje potrebe venepunkcija.

Koncentraci faktora VIII primjenjuju se epizodno u slučaju akutnog krvarenja, a preventivno u slučaju aktivnosti koja nosi povećani rizik krvarenja. Profilaktično liječenje danas je zlatni standard u liječenju hemofilije s ciljem održavanja razine aktivnosti faktora VIII  $\geq 1$  %, što značajno smanjuje pojavu akutnih, spontanih krvarenja (8). Dva su oblika profilaktičkog liječenja. Primarna profilaksa počinje rano u djetinjstvu prije prvog ili nakon prvog krvarenja u veliki zglobov, a sekundarna nakon više epizoda krvarenja (9). Lijek se može primijeniti u kućnim uvjetima. U slučaju akutnog krvarenja potrebno je lijek primijeniti unutar 2 sata od početka krvarenja. Zbog toga krvarenje brže prestaje i potrebna je manja doza lijeka (10, 11).

#### **1.1.5. Komplikacije liječenja hemofilije**

Najteža je komplikacija liječenja hemofilije A pojava inhibitora, protutijela na FVIII. U teškom obliku bolesti javljaju se u 20 – 30 % bolesnika, dok u umjerenom ili blagom obliku bolesti učestalost je mnogo manja (12). Titar inhibitora od 5 Bethesda jedinica (BU) smatra se granicom niskog i visokog titra. Sklonost razvoju inhibitora ovisi o mnogobrojnim faktorima kao genetskoj osnovi bolesti, imunološkoj reaktivnosti organizma, vrsti i načinu primjena koncentrata faktora VIII.

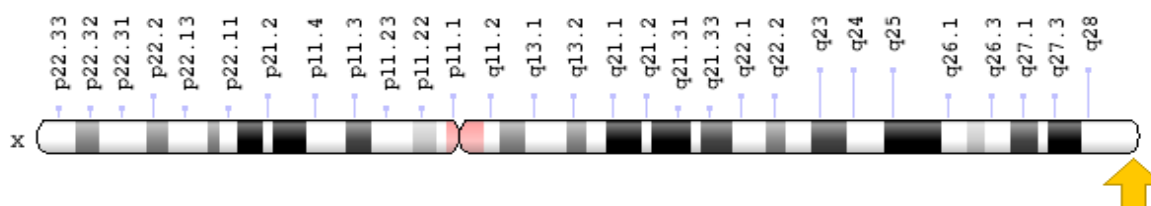
Bolesnici s inhibitorima danas se liječe lijekovima koji zaobilaze aktivnost faktora VIII, i to su rFVIIa i aPCC (13). Važno je liječenje bolesnika s hemofilijom i inhibitorima započeti što je moguće ranije zbog bržeg prekida krvarenja i manjeg oštećenja zglobova (14, 15).

Koncentraci faktora zgrušavanja koji su proizvedeni iz ljudske plazme mogu prenijeti HAV, HBV, HCV, HDV i HEV, HIV, zatim EBV, CMV, Parvovirus B 19, toxoplazmozu i malariju (16). Moderne tehnike virusne inaktivacije u koncentratima faktora zgrušavanja podrijetla ljudske plazme smanjile su rizik infekcije. Liječenje HCV-a danas je moguće novim

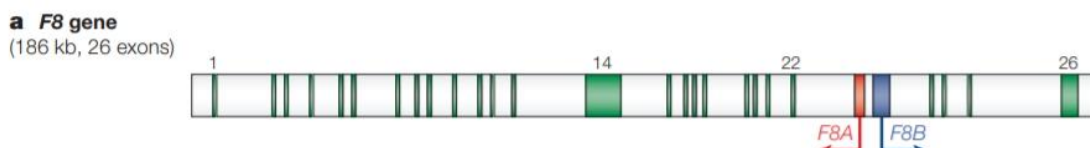
antivirusnim lijekovima tijekom tri mjeseca i uspješnost je oko 95 %. Liječenje bolesnika s hemofilijom i HIV infekcijom moguće je kao i liječenje osoba bez hemofilije, antivirusnim lijekovima (HAART). Danas još nema izlječenja hemofilije osim transplantacijom jetre (17) u bolesnika koji boluju od terminalne bolesti jetre.

## 1.2 Struktura i funkcija gena za FVIII

Gen faktora 8 (F8) lociran je na terminalom dijelu dugog kraka kromosoma X u regiji Xq28 (Slika 1.) Dug je 186 kb, što predstavlja 0,1 % čitavog X kromosoma i jedan je od najvećih gena u genomu čovjeka. On kodira protein FVIII. U strukturi gena za FVIII nalazi se 26 egzona obilježenih brojevima od 1 – 26 (Slika 2.) i mRNA transkript od 9 kb. Veličine se razlikuju od 69 do 262 nukleotida. Izuzetci su egzon 14 čija je dužina 3 106 bp i egzon 26 koji ima dužinu 1 958 bp. U okviru gena postoji i 25 introna veličine od 207 do 32 400 bp koji čine 177 kb. Gen je kloniran 1984. godine, istovremeno u više istraživačkih timova (18, 19, 20).



Slika 1. Mjesto gena F8 na dugom kraku X kromosoma: Xq28



Slika 2. Gen za FVIII

### 1.2.1. Mutacije gena za FVIII

Do danas je otkriveno, registrirano i objavljeno 2 107 jedinstvenih mutacija u genu F8 koje uzrokuju hemofiliju A zabilježenih na internetskoj bazi podataka (F8 HAMSTeR). Od navedenih, 938 je mutacija krivog smisla koje se nalaze u 37 % bolesnika s teškim oblikom

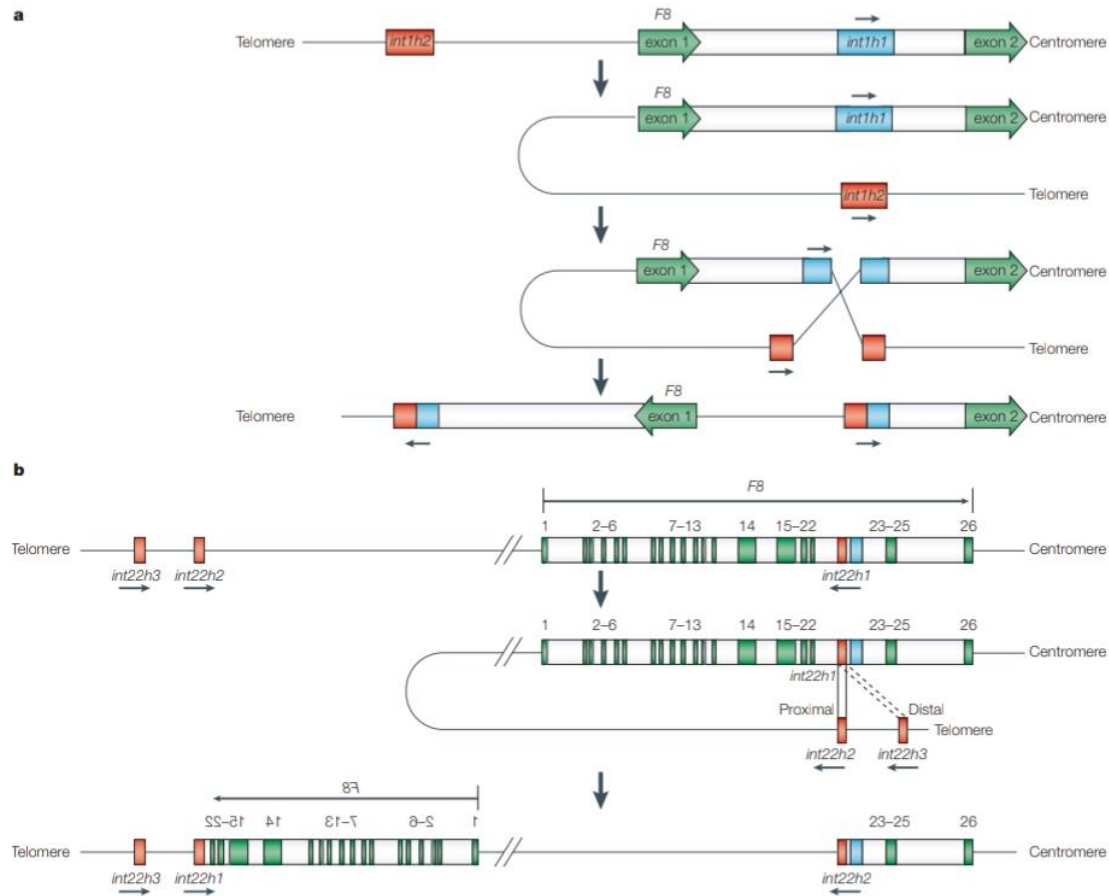
hemofilije A, 72 % u bolesnika s umjerenom hemofilijom A i u 88 % s blagom hemofilijom A. Inverzija introna 22 javlja se u 40 – 45 % bolesnika s teškim oblikom bolesti, dok se inverzija introna 1 javlja u 2 – 3 % (21).

#### **1.2.1.1. Inverzija introna 22**

Najčešća mutacija u bolesnika s teškim oblikom hemofilije A jest inverzija introna 22. Inverzija intron 22 sadrži 32 kilobaze (kb) i nastaje zbog intrakromosomske rekombinacije između regije u intronu 22 unutar gena F8 (int22h-1) i jedne od dviju izvangenskih kopija int22h-2 i int22h-3. Izvangenski su homolozi (int22h-2 i int22h-3) u suprotnoj orijentaciji u odnosu na int22h-1 pa kao posljedica rekombinacije nastaje inverzija. (Slika 3.)

Naylor i Lakich među prvima su dokazali inverziju introna 22 gena F8 u oboljelih od teškog oblika hemofilije A s učestalošću od 43 i 45 %. (22, 23). Navedeni rezultati potvrđeni su na uzorku od 2093 bolesnika s hemofilijom A i utvrđena je učestalost inv22 od 43 % (24). Bagnall i suradnici (25) objašnjavaju razvoj teškog oblika bolesti kod bolesnika s prisutnom inv22. Teški oblik bolesti nastaje uslijed velike mutacije koja narušava strukturu F8 gena bez egzona 23-26 te ne dolazi do sinteze faktora VIII.

Poznata su dva tipa inverzije, proksimalna i distalna, a ovisi s kojom je ekstragenomskom kopijom došlo do rekombinacije. Proksimalna inverzija ili tip II je rekombinacija s proksimalnom kopijom (int22 h-2), a distalna inverzija ili tip I uključuje distalniju kopiju (int22 h-3) (21). Učestalost Int22h-1/int22h-2 (tip II) je viša u odnosu na distalnu inverziju introna 22-h-1/22h-3.



Slika 3. Patološka inverzija gena za FVIII

### 1.2.1.2. Inverzija introna 1

Inverzija introna 1 nastaje zbog homologne rekombinacije između 1041 pb regije introna 1 (*int1h-1*) gena F8 i njegove suprotno orijentirane izvangenske kopije (*int1h-2*) smještene približno 140 kb telomerno u odnosu na gen F8. (24,26). Brinke i suradnici (28) prvi su uočili da hemofilija A može nastati kao rezultat inverzije introna 1. Na temelju mutirane DNK strukture formiraju se dvije hibridne iRNK, jedna za promotorsku regiju i intron 1 gena F8, a druga je formirana od ostatka gena F8 i početnih dijelova C6.1A. Na temelju takvih struktura nije moguća sinteza funkcionalnog proteina FVIII i nastaje teški oblik hemofilije A.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja su:

1. Ispitati prevalenciju mutacija inverzije introna 22 i inverzije introna 1 u genu za FVIII bolesnika s hemofilijom A.
2. Ispitati učestalost postojanja inhibitora na FVIII u bolesnika s prisutnim mutacijama inverzije introna 22 i introna 1 gena F8 u bolesnika bez mutacija.
3. Ispitati postoji li razlika u mutacijama inverzije introna 22 i introna 1 s obzirom na težinu hemofilije.
4. Analizirati kliničke karakteristike bolesnika s dokazanim mutacijama inverzije introna 22 i inverzije introna 1 gena FVIII.

### **3. ISPITANICI I METODE**

#### **3.1 Ustroj studije**

Ovo je presječno istraživanje s povijesnim podacima (29) izrađeno na Kliničkom odjelu za hematologiju, KBC-a Osijek, na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, Odjelu za citogenetiku, Odjelu za laboratorijsku hematologiju i koagulaciju te Referentnom centru Ministarstva zdravstva RH za nasljedne i stečene bolesti hemostaze.

#### **3.2 Ispitanici**

U istraživanje je uključeno 80 bolesnika s dijagnozom hemofilije A. Uključeni su bolesnici s hemofilijom A kojima je određena mutacija inverzije introna 22 i introna 1 gena za FVIII i to od siječnja 2014. godine pa do kraja prosinca 2017. godine.

#### **3.3 Metode**

Podatci su uzeti iz medicinske dokumentacije bolesnika. Krv pacijenata izvadilo je kvalificirano medicinsko osoblje i prosljedilo na Odjel za citogenetiku te Odjel za laboratorijsku hematologiju i koagulaciju. Određivanje aktivnosti F8 učinjeno je modifikacijom metode APTT (APTT, IL Test Kit), u automatskom koagulometru 7000 (Instrumentation Laboratory Spa). Iz uzoraka krvi (leukociti periferne krvi) pacijentima je izolirana DNA uobičajenom metodom. Inverzija introna 22 te introna 1 određivana je primjenom metode umnažanja dugih odsječaka DNA LD-PCR. Navedenom metodom umnaža se neoamplikon koji nastaje kada se intronski homolog int22h-1 rekombinira s jednim od unutargenskih homologa (int22h-2 ili int22h-3). Koriste se četiri različite početnice P, Q, A i B čije sekvence su komplementarne bočnim sekvencama int22h-1, int22h-2 ili int22h-3. Analizom PCR produkata dobivenih umnažanjem različitih kombinacija oligonukleotidnih početnica, moguće je razlikovati pacijenta s inverzijom introna 22 kao i pacijenta kod kojih inverzije nema. S ciljem analize LD-PCR produkata korištena je standardna agarozna gel elektroforeza (30).

### 3.4 Statističke metode

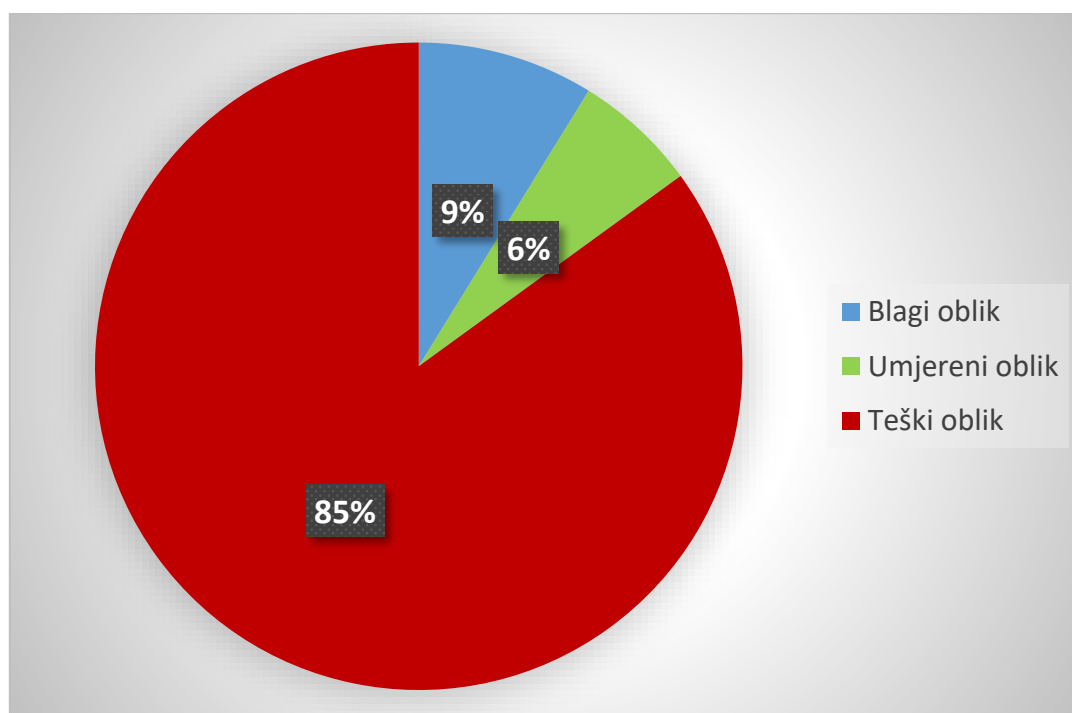
Kategorijski podatci predstavljeni su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Numerički podatci opisani su medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Razlike kategorijskih varijabli testirane su Fisherovim egzaktnim testom. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Sve su P vrijednosti dvostrane. Razina značajnosti postavljena je na  $\alpha = 0,05$  (31).

Za statističku analizu korišteni su statistički programi MedCalc Statistical Software version 18.2.1 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <http://www.medcalc.org>; 2018) i SPSS Statistics 17.0 Release 17.0.1 (Dec 1, 2008).



## 4. REZULTATI

Istraživanje je provedeno na 80 bolesnika, svi su muškog spola koji boluju od hemofilije tipa A, središnje dobi (medijana) 41 godina (interkvartilnog raspona 27 do 50 godina) u rasponu 8 do 80 godina.



Slika 4. Raspodjela bolesnika prema težini hemofilije

Teški oblik bolesti ima 68 (85 %) bolesnika, umjereni njih 5 (6,3 %), dok je kod 7 (8,8 %) ispitanika bolest u blagom obliku.

Inverzija introna 1 nije dokazana niti u jednog bolesnika.

Inverziju introna 22 ima 29 (36,3 %) ispitanika, od kojih je 28 (41,2 %) s teškim oblikom hemofilije A. Prisutne inhibitore na faktor VIII ima 14 bolesnika s teškim oblikom bolesti (20,6 %). Bolesnici s umjerenim ili blagim oblikom nisu imali dokazane inhibitore i stoga nema razlike u odnosu na težinu bolesti (Tablica 2.).

Tablica 2. Raspodjela bolesnika prema inverziji introna 22 i inhibitoru u odnosu na težinu hemofilije A

Broj (%) bolesnika u odnosu na težinu bolesti					P*
	Teški	Umjereni	Blagi	Ukupno	
Inverzija introna 22					
Ne	40 (58,8)	4/5	7/7	51 (63,8)	0,06
Da	28 (41,2)	1/5	0	29 (36,3)	
Pozitivan inhibitor					
Ne	54 (79,4)	5/5	7/7	66 (82,5)	0,37
Da	14 (20,6)	0	0	14 (17,5)	
Ukupno	68 (100)	5/5	7/7	80 (100)	

\*Fisherov egzakti test

Od ukupno 80 bolesnika, njih je 29 (36,3 %) s prisutnom inverzijom introna 22, a samo 5 (35,7 %) ima pozitivne inhibitore na faktor VIII (Tablica 3.).

Tablica 3. Bolesnici prema inverziji introna 22 i pozitivnosti inhibitora

Inverzija introna 22	Broj (%) bolesnika u odnosu na inhibitor			P*
	Nije pozitivan	Pozitivan	Ukupno	
Ne	42 (63,6)	9 (64,3)	51 (63,8)	> 0,99
Da	24 (36,4)	5 (35,7)	29 (36,3)	
Ukupno	66 (100)	14 (100)	80 (100)	

\*Fisherov egzakti test

U svih 80 bolesnika utvrđena je količina potrebnog lijeka za liječenje tijekom mjesec dana. Utvrđena je značajna razlika u potrošnji količine lijeka tijekom mjesec dana s obzirom na težinu bolesti (Fisherov egzaktni test,  $P < 0,001$ ) (Tablica 4.).

Tablica 4. Potrošnja količine lijeka u odnosu na težinu bolesti

	Broj (%) bolesnika u odnosu na oblik bolesti				P*
	Teški	Umjereni	Blagi	Ukupno	
Potrošnja lijeka					
OD	4 (5,9)	1/5	7/7	12 (15)	<b>&lt; 0,001</b>
do 12000 IU	15 (22,1)	2/5	0	17 (21,3)	
12 – 22000 IU	24 (35,3)	1/5	0	25 (31,3)	
22000 IU i više	20 (29,4)	1/5	0	21 (26,3)	
50 – 80 mg	1 (1,5)	0	0	1 (1,3)	
100 mg	4 (5,9)	0	0	4 (5,0)	
Ukupno	68 (100)	5/5	7/7	80 (100)	

\*Fisherov egzaktni test

Usporedbom mjesečne potrebe za liječenje bolesti u količini lijeka i prisutnosti inverzije introna 22 nije utvrđena značajna razlika (Tablica 5.).

Nema značajne razlike u potrošnji količine lijeka s obzirom na inverziju introna 22 (Tablica 5.).

Tablica 5. Potrošnja količine lijeka u odnosu na inverziju introna 22

	Broj (%) bolesnika u odnosu na inverziju introna 22			P*
	Ne	Da	Ukupno	
Potrošnja lijeka				
OD	10 (19,6)	2 (6,9)	12 (15)	0,20
do 12.000 IU	13 (25,5)	4 (13,8)	17 (21,3)	
12 – 22.000 IU	14 (27,5)	11 (37,9)	25 (31,3)	
22000 IU i više	14 (27,5)	12 (41,4)	26 (32,5)	
Ukupno	51 (100)	29 (100)	80 (100)	

\*Fisherov egzaktni test

## 5. RASPRAVA

Mutacije gena za FVIII u bolesnika s hemofilijom A brojne su. Opisano je preko dvije tisuće mutacija pomaka okvira čitanja, krivoga smisla i besmislenih mutacija, osim insercija i inverzija. Gen za FVIII (F8) kloniran je 1984. godine (18, 19, 20).

Najčešća mutacija u teškom obliku hemofilije A jest inverzija introna 22 gena za FVIII i odgovorna je za 40 – 50 % svih slučajeva teške bolesti. Prisutna je u svim etničkim skupinama. Kod 1 – 5 % bolesnika teški oblik bolesti hemofilije A nastaje uslijed inverzije introna 1 gena F8. Obje inverzije posljedica su intrakromosomske rekombinacije sekvence introna 1 ili introna 22 s homolognim izvangenskim kopijama (31).

Inverzija introna 22 gena F8 nastaje rekombinacijom između malog gena nazvanog gen A (F8A, int22h-1) smještenog unutar introna 22 gena FVIII. Dodatne kopije gena A (F8A, int22h-2 i int22h-3) smještene su uzvodno na telomernom kraju X kromosoma. Udaljene su od gena F8 500 kb. Regije int22h duge su oko 9,5kb i međusobno su homologne 99 %. Inverzija introna 22 nastaje zbog intrakromosomske rekombinacije između regije u intronu 22 (int22) unutar gena F8 (int22h-1) i jedne od dviju u gotovo identičnim izvangenskim kopijama int22h-2 i int22h-3. Izvangenski homolozi (int22h-2 i int22h-3) u suprotnoj su orijentaciji u odnosu na int22h-1 pa kao posljedica rekombinacije nastaje inverzija. Zbog inverzije dolazi do udaljavanja egzona 1-22 od egzona 23-26, što uzrokuje raskid gena za FVIII i vrlo nisku do nemjerljivu aktivnost FVIII.

Inverzija introna 22 te introna 1 određuje se primjenom metode umnažanja dugih odsječaka DNA-LD-PCR koja je s vremenom potisnula Southern blot analizu i omogućila bržu i jednostavniju dijagnostiku (28).

Inverzija introna 1 nastaje zbog homologne rekombinacije između 1041 pb regije introna 1 (int1h-1) gena F8 i njegove suprotno orijentirane izvangenske kopije (int1h-2) smještene približno 140 kb telomerno u odnosu na gen F8. Inv1 uzrokuje odvajanje i suprotnu orijentaciju egzona 1 u odnosu na ostatak gena i uzrok su promjene strukture gena F8 i odsutnost funkcionalnog faktora VIII.

U bolesnika s teškim oblikom hemofilije A, prevalencija inverzije introna 22 je 41,2 %. To je prvo istraživanje genetičkog uzroka nastanka hemofilije A, prevalencije introna 22 gena F8 i

introna 1 gena F8 u Hrvatskoj populaciji bolesnika s hemofilijom A. Utvrđena učestalost nije statistički različita od ostalih populacija objavljenih u literaturi.

Usporedne analize prisutnosti *inv22* i *inv1* u uzorku bolesnika s hemofilijom A objavljene su i nije zabilježena istovremena pojava obaju mutacija. Prisutna je samo jedna mutacija, tj. *inv22* ili *inv1* gena za FVIII. Po svemu nastanak jedne mutacije onemogućava nastanak druge, tj. postojanje inverzije introna 22 onemogućava postavljanje X kromosoma u položaj koji bi doveo do intrakromosomske rekombinacije *int1-h* struktura i suprotno (31).

Učestalost inverzije introna 22 u grupi bolesnika s teškim oblikom hemofilije A u različitim drugim populacijama i to iz europskih država (Slovenije, Srbije, Njemačke, Italije, Španjolske i Velike Britanije), azijskih država (Indije, Kine i Koreje) i država Amerike (Meksiko, Argentina, Brazil i Čilea) prikazana je u Tablici 6..

Tablica 6. Učestalost inverzije introna 22 u različitim etničkim populacijama (33)

<i>Etnička populacija</i>	<i>Učestalost inv22</i>	<i>Referenca</i>
Srbija	18/46 (39,1 %)	Ilić i sur. 2014.
<b>Europske države</b>		
Slovenija	40/82 (48,8 %)	Debeljak i sur. 2012.
Njemačka	339/753 (45 %)	Olenburg i sur. 2006.
Italija	451/874 (52 %)	Margalione i sur. 2003.
Španjolska	42/102 (42 %)	Cassana i sur. 2008.
Velika Britanija	94/209 (45 %)	Bagnall i sur. 2002.
<b>Azijske države</b>		
Indija	35/80 (44 %)	Faridi i sur. 2012.
Koreja	30/100 (33 %)	Kim i sur. 2012.
Kina	57/148 (38,5 %)	Xue i sur. 2010.
<b>Američke države</b>		
Meksiko	14/31 (45 %)	Mantilla-Capacho i sur. 2007.
Argentina	25/64 (39 %)	Rosseti i sur. 2004.
Brazil	46/107 (43 %)	Leiria i sur. 2009.

Gotovo identične rezultate nalaze brojni autori. Mantilla-Capacho i suradnici ispitivali su 44 pacijenata s teškom hemofilijom A na teritoriju Meksika sa 7 etničkih populacija i ne nalaze značajnu razliku u učestalosti inverzije introna 22 (33). Talijanski autori Margalione i suradnici obradili su populaciju bolesnika s hemofilijom A i usporedili s pet studija različitog

etničkog porijekla i utvrdili identičan rezultat (34). Vrlo slične rezultate dobili su istraživači u Sloveniji (35) te Srbiji (32).

Inverzija introna 22 u bolesnika s hemofilijom A umjerene težine bolesti vrlo je rijetka. Opisano je u radu Abou-Elewa i suradnika kako 10 % bolesnika s umjerenom hemofilijom A ima dokazanu inverziju introna 22 (36). Razmatra se da je određivanje aktivnosti FVIII različitom primjenom različitih testova i da je izbor metode za određivanje aktivnosti FVIII uzrok neslaganja uočenog fenotipa s genotipom.

Analiza učestalosti inv 1 učinjena je u bolesnika sa svim težinama hemofilije A. Rezultati Bagnall i suradnika (24) navode učestalost od 4,8 % u populaciji bolesnika s teškom hemofilijom A, što se slaže s ostalim objavljenim rezultatima (Tablica 7.).

Tablica 7. Učestalost inverzije introna 1 u različitim etničkim populacijama (32)

<i>Etnička populacija</i>	<i>Učestalost inv22</i>	<i>Referenca</i>
Srbija	3/46 (6,52 %)	Ilić i sur. 2014.
<b>Europske države</b>		
Slovenija	0/82 (0 %)	Debeljak i sur. 2012.
Njemačka	19/753 (2,5 %)	Olenburg i sur. 2006.
Italija	19/874 (6 %)	Margalione i sur. 2003.
Španjolska	4/102 (3 %)	Cassana i sur. 2008.
Velika Britanija	10/209 (4 %)	Bagnall i sur. 2002.
<b>Azijske države</b>		
Indija	3/80 (4 %)	Faridi i sur. 2012.
Koreja	1/100 (1 %)	Kim i sur. 2012.
Kina	3/148 (2 %)	Xue i sur. 2010.
<b>Američke države</b>		
Meksiko	0/31 (0 %)	Mantilla-Capacho i sur. 2007.
Argentina	1/64 (1,6 %)	Rosseti i sur. 2004.
Brazil	3/107 (2,8 %)	Leiria i sur. 2009.

Prisutnost inverzije introna 1 u bolesnika s umjerenom i blagom hemofilijom A nije do sada opisano u svjetskoj literaturi.

Različiti su uzroci razvoja protutijela, inhibitora na FVIII u bolesnika s hemofilijom A, a među najvažnijim je prisutnost visoko rizičnih mutacija. Tako je inverzija introna 22 jedna od visoko rizičnih mutacija za razvoj inhibitora, uz velike delecije i mutacije krivog smisla gena

za FVIII. Prevalencija inhibitora u bolesnika koji nose mutaciju inv 22 je 7 – 10 puta viša nego u drugih manje rizičnih mutacija.

U ispitivanoj skupini od 80 bolesnika s hemofilijom A 14 (20,6 %) bolesnika s teškim oblikom bolesti imalo je prisutne inhibitore. Od 29 (36,3 %) bolesnika s prisutnom inverzijom introna 22 gena za F8, njih 5 (35,7 %) imalo je pozitivne inhibitore na FVIII. To je jedan od razloga zašto je neophodno već pri postavljanju dijagnoze bolesti učiniti genetiku i utvrditi mutaciju. Na taj je način moguće procijeniti razinu rizika za razvoj inhibitora i zauzeti određen terapijski pristup tim bolesnicima.

Opisano je kako teži oblik bolesti ima veće potrebe za primjenom terapije. Tako je u ovom istraživanju utvrđena statistička značajnost veće mjesečne potrebe za lijekom u bolesnika s težim oblikom bolesti. Usporedbom bolesnika s prisutnom inverzijom introna 22 i onih bez inverzije nije se utvrdila razlika u mjesečnoj potrebi za lijekom. Prisutnost inverzije introna 22 utvrđena je u bolesnika s teškim oblikom bolesti pa je bilo za očekivati potrebu za većom mjesečnom količinom lijeka. Naime, u tu skupinu ubrajaju se bolesnici koji imaju inhibitore na FVIII i liječe za lijekovima koji zaobilaze aktivnost FVIII (rFVIIa i aPCC) i aktivnost lijeka različito se izražava.



## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata, može se zaključiti:

1. Učestalost mutacije inverzije introna 22 u 80 bolesnika s teškim oblikom hemofilije A iznosi 41,2 %, što je prvi puta istraženo u bolesnika u Hrvatskoj populaciji bolesnika s hemofilijom A.
2. Rezultati učestalosti mutacije inverzije introna 22 za hrvatske bolesnike s hemofilijom A sukladni su objavljenim izvještajima u svjetskoj literaturi.
3. Mutacija inverzija introna 1 nije dokazna niti u jednog bolesnika s hemofilijom A.
4. Ukupno 29 bolesnika od 80 (36,4 %) ima inverziju introna 22.
5. Od 29 bolesnika s prisutnom inverzijom introna 22 njih 5 (35,7 %) ima prisutne inhibitore na FVIII.
6. Prisutnu mutaciju inverziju introna 22 imaju bolesnici s teškim oblikom hemofilije A.
7. U ispitivanoj skupini od 80 bolesnika s hemofilijom A značajno veće količine lijeka primaju bolesnici s teškim oblikom bolesti.
8. Usporedbom bolesnika s inverzijom introna 22 i onih bez inverzije nije statistički dokazana razlika s obzirom na mjesečnu potrošnju lijeka.

## 7. SAŽETAK

**Ciljevi istraživanja:** Cilj je rada utvrditi prevalenciju mutacija inverzije introna 22 i inverzije introna 1 u genu za FVIII u hrvatskoj populaciji bolesnika s hemofilijom A te ispitati učestalost inhibitora u bolesnika s prisutnim mutacijama.

**Nacrt studije:** Presječno istraživanje s povijesnim podacima.

**Ispitanici i metode:** Iz medicinske dokumentacije preuzeti su podatci za 80 bolesnika s hemofilijom A. Testirani su na inverziju introna 22 i introna 1 gena za FVIII. Mutacije su dokazane primjenom metode umnažanja dugih odsječaka DNA-LD-PCR, a aktivnost FVIII i prisutnost inhibitora na FVIII standardnim koagulacijskim metodama.

**Rezultati:** Od ukupno 80 bolesnika s hemofilijom A, u njih 28 s teškim oblikom hemofilije A dokazana je prisutnost inverzije introna 22, što iznosi 41,2 %. U 29 bolesnika s prisutnom inverzijom introna 22, samo 5 bolesnika (35,7 %) ima prisutne inhibitore na FVIII. U niti jednog bolesnika nije dokazana mutacija inverzije introna 1. Statistički je značajno veća mjesečna potrošnja koncentrata FVIII u bolesnika s teškim oblikom bolesti u odnosu na umjereni i blagi oblik, dok prisutnost inverzije introna 22 u bolesnika s hemofilijom A ne nalazi razlike u potrošnji lijeka.

**Zaključak:** Prevalencija najčešće mutacije u teškog oblika hemofilije A, inverzije introna 22 u bolesnika s teškim oblikom bolesti iznosi 41,2 %. Podatci o prevalenciji inverzije introna 22 i introna 1 po prvi su put istraženi za hrvatsku populaciju bolesnika s hemofilijom A. Povezanost mutacije s pojavom inhibitora na FVIII poznata je i u naših bolesnika i iznosi 35,7 %.

**Ključne riječi:** hemofilija A; inverzija introna 22; inverzija introna 1; inhibitori na FVIII

## 8. SUMMARY

**Aims of the study:** To determine the prevalence of intron 22 and intron 1 inversions of factor VIII gene in Croatian population in patients with haemophilia A and to investigate the frequency of inhibitors in patients with present mutations.

**Study design:** The study is constructed as a cross-sectional study.

**Participants and methods:** The data of 80 haemophilia patients were taken from medical documentation. Study included 80 patients, 68 of whom (85%) have a severe type of haemophilia A, 5 (6.3%) have a moderate type of the disease and 7 (8.8%) patients have the mild type. Mutations are proven by using the LD-PCR method and activity of FVIII and the presence of inhibitors to FVIII by standard coagulation tests.

**Results:** From 80 haemophilia A patients, 28 suffer from the severe type of haemophilia A, inversion of intron 22 has been detected with the frequency of 41.2%. In 29 patients with detected intron 22 inversion only 37.5% have inhibitors of FVIII. Mutations of intron 1 have not been detected in any of the examined patients. There is a statistically significant usage of FVIII concentrates in patients with the severe type of the disease in comparison to the moderate and mild type, while presence of inversion 22 does not meet the statistical difference in the usage of the drug.

**Conclusion:** The prevalence of the most common mutation in a severe type of haemophilia A, inversion of intron 22 is 41.2%. The prevalence data of inversion 22 and intron 1 are investigated for the first time in Croatian population of patients with haemophilia A. Linkage analysis between mutations and presence of inhibitors to FVIII in our patients with haemophilia is 35.7%, which has already been already observed in the literature.

**Keywords:** haemophilia A; intron 22 inversions; intron 1 inversions; inhibitors to FVIII

## 9. LITERATURA

1. Berntorp E, Shapiro D. A. Modern haemophilia care. *Lancet*. 2012; 379: 1447–56
2. Manucci PM. Hemophilia and related bleeding disorders: a story of dismay and success. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.*, 2002.
3. Lobet S, Hermans C and Lambert C. Optimal management of hemophilic arthropathy and hematomas. *J Blood Med* 2014;5:207-218.
4. White GC, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J. Definitions in Hemophilia. Classification of the severity of hemophilia. On behalf of the factor VII and factor IX. Subcommittee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 2000; 85:560.
5. Fijnvandraat K, Cnossen MH, Leebeek FWG, Peters M. Diagnosis and management of haemophilia. *BMJ* 2012;344:36-40.
6. Peyvandi F, Jayandharan G, Chandy M i sur. Genetic diagnosis of haemophilia and other inherited bleeding disorders. *Haemophilia* 2006;3:82-9.
7. Liew K. Many factor VIII products available in the treatment of hemophilia A: an embarrassment of riches? *J Blood Med* 2017; 8:67-73.
8. Manco-Johnson MJ, Thomas TC, Abshire CA i sur. Prophylaxis versus episodic treatment to preven joint disease in boys with severe hemophilia. *N Engl J Med* 2007; 575:535-544.
9. Ljung R. Aspects of prophylactic treatment of hemophilia. *Thrombosis Journal* 2016;14(Suppl 1):30-35.
10. Berntorp E, Moerlose P, Ljung RC. The role of prophylaxis in bleeding disorders. *Haemophilia* 2010;15:353-358.
11. Teitel JM, Barnard D, Israels S, Lillicrap D, Poon MC, Sek J. Home management of haemophilia. *Haemophilia* 2004;10(2):118-133.
12. Franchini M, Manzato F, Salvagno GL i sur. Prophylaxis in congenital hemophilia with inhibitors: the role of recombinant activated factor VII. *Semin Thromb Hemost* 2009;35:814-819.
13. Witmer C and Young G. Factor VIII inhibitors in hemophilia A. Rationale and latest evidence. *Ther Adv Hematol* 2013; 4(1):59-72.
14. Šalek SZ, Benson GM, Elezović I i sur. The need for speed in the management of haemophilia patients with inhibitors. *Haemophilia* 2011;17:95-102.

15. Morfini M, Haya S, Tagariello G i sur. European study on orthopaedic status of haemophilia patients with inhibitors. *Haemophilia* 2007;13(5):606-612.
16. Burnouf T. Reducing risk of infection from plasma products: specific preventative strategies. *Blood Rev* 2000;2:94-110.
17. Lewis JH, Bontempo F.A, Spero J.A i sur. Liver transplantation in a hemophiliac. *N Engl J Med* 1985;312(18):1189-1190.
18. Toole JJ, Knopf JL, Wozney J i sur. Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. *Nature* 1984;312:342.
19. Gitschier J, Wood WI, Goralka TM i sur. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 1984, 312:326-330.
20. Wood WI, Capon DI, Simonsen CC i sur. Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. *Nature* 1984;312:330.
21. Lakich D, Kazazian HH, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are common cause of severe Haemophilia A. *Nature Genetics*. 1993;5:236-241.
22. Naylor JA, Buck D, Green PM, Williamson H, Bentley D, Giannelli F. Investigation of the factor VIII intron 22 repeated region (int22h) and the associated inversion junctions. *Hum Mol genet* 1995;4:1217-24.
23. Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M i sur. Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A. Results of an international consortium study. *Blood* 1995;15;86(6):2206-12.
24. Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood*. 2002;99.168-174.
25. Bagnall RD, Giannelli F, green PM. Polymorphism and haemophilia A causing inversions in distal Xq28: a complex picture. *J Thromb Haemost* 2005; 3:2598-9.
26. Liu Q, Nozari G, Sommer SS. Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in haemophilia A. *Blood*. 1998;92:1458-1459.
27. Brinke A, Tagliavacca L, Naylor J, Green P, Giangrande P, Giannelli F. Two chimaeric transcription units result from an inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene and as region reportedly affected by reciprocal translocations in T-cell leukaemia. *Hum Mol Genet* 1996;5. 1945-1951.
28. Marušić M i sur. Uvod u znanstveni rad u medicini. 4. izd. Zagreb:Medicinska naklada; 2008
29. Crkvenac-Gornik K, Mikloš M, Huljev – Frković S, Đurišević-Tonković I, Bilić E, Zupančić- Šalek S. Određivanje inverzije introna 22 i introna 1 u genu za faktor

- zgrušavanja VIII kod pacijenata s teškim oblikom hemofilije A. Bilten Krohema 2015; 7(1):40-42.
30. Ivanković D i sur. Osnove statističke analize za medicinare. 1 izd. Zagreb: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 1988.
31. Oldenburg J, Pavlova A. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Haemophilia* 2006;12(86):15-22.
32. Ilić S.N, Distribucija mutacija u F8 genu kod pacijenata iz Srbije obolelih od hemofilije A. Doktorska disertacija Beograd 2014.
33. Mantilla-Capacho JM, Beltran-Miranda CP, Luna-Zaizar H i sur. Frequency of intron 1 and 22 inversions of factor VIII gene in Mexican patients with severe hemophilia A. *Am J Hematol* 2007;82:283-287.
34. Margaglione M, Castaman G, Morfini M i sur. The Italian AICE-genetics hemophilia A database: results and correlation with clinical phenotype. *Haematologica* 2008; 93(5):722-728.
35. Debljak M, Kitanovski L, Trampus-Bakija A, Benedik-Dolnic M. Spectrum of F8 gene mutations in haemophilia A patients from Slovenia. *Haemophilia* 2012;20:e136-143.
36. Abou-Elew H, Ahmed H, Raslan H i sur. Genotyping of intron 22 –related rearrangements of F8 by inverse-shifting PCR in Egyptian hemophilia A patients. *Ann Hematol* 2011;90:579-84.

## 10. ŽIVOTOPIS

Ime i Prezime: Nives Šalek

Datum i mjesto rođenja: 17. 7. 1993., Zagreb

Adresa stanovanja: Huttlerova 12, 31 000 Osijek

Kontakt: 091/3375 – 199

E-mail: salek.nives@gmail.com

### OBRAZOVANJE:

2000 – 2008: Osnovna škola Samobor, Samobor

2008 – 2012: Opća gimnazija A. G. Matoš, Samobor

2012 – 2018. Medicinski fakultet Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, studij medicine

### AKTIVNOSTI

2012. – 2018. Članica udruge CROMSIC (*Croatian Medical Students' International Committee*)

2012. – 2018. Članica udruge EMSA (*European Medical Students' Association*)

2015 – 2017. Demonstrator na katedri za farmakologiju, Medicinski fakultet Osijek

2016/8mj. sudjelovala na jednomjesečnoj bilateralnoj razmjeni studenata u Češkoj,

2017/9mj. sudjelovala na jednomjesečnoj bilateralnoj razmjeni studenata u Španjolskoj

2018. sudjelovala na jednomjesečnoj bilateralnoj razmjeni studenata u Italiji

2014. aktivno sudjelovala na Međunarodnom studentskom kongresu u Pečuhu

2014, 2016. aktivno sudjelovala na Studentskom kongresu neuroznanosti – NEURI

2016. aktivno sudjelovala na 39. Međunarodnom kongresu studenata medicine na Ohridu, Makedonija